

特集 基礎研究から発展した美容医療

培養真皮線維芽細胞移植による顔面皮膚の若返り術

北條元治 吉田 純 光 彩乃

The Japanese Journal of Plastic
Surgery, Vol. 53, No. 10, 2010
形 成 外 科
第 53 卷 第 10 号 別 刷
克 誠 堂 出 版 株 式 会 社

培養真皮線維芽細胞移植による顔面皮膚の若返り術

北條元治*1, *3 吉田 純*2 光 彩乃*1, *4

Key words : 細胞培養 再生医療 産業化

はじめに

自己の真皮線維芽細胞を顔面のしわに注入し改善を図る治療法は、米国の Isolagen 社（現 Fibrocell Science 社）が 1995 年に実用化した方法である¹⁾。その後、除皺術としての自己培養真皮線維芽細胞移植術は FDA の第 3 相臨床試験まで終了し、一応の安全性ならびに有効性は確認されるに至っている²⁾。

本治療の作用機序は、真皮内に移植された細胞が真皮線維成分を分泌し、それらが蓄積することでしわやたるみが改善されるというものであり³⁾⁴⁾、これらの現象は動物実験でも確かめられている⁵⁾。美容外科手術や filler 注入のように、医師が直接手を下して形態を整える治療とは異なり、細胞による皮膚の修復を期待する治療である。したがって、劇的な効果は期待できず、従来の美容医療にとってかわるようなものではない。しかし、人間の手による操作ではないため、いわゆる失敗と呼ばれるエラーが生じるリスクはゼロに等しく、また非自己の物質を注入する filler 治療とは異なり、自己の真皮成分による変化であるため、短期間で分解・吸収されることはなく、異物反応やアレルギー反応のような副

作用に悩まされることもないといった有利性がある²⁾。われわれは、Isolagen 社の治療プロトコルならびに培養方法を、若干の修正を加えてはいるもののほとんど現法のまま追試を行い、有効性と安全性を確認した。本稿ではわれわれが行っている自己培養真皮線維芽細胞を用いた顔面若返り術について述べる。

I 真皮線維芽細胞の培養・管理

1. 材料

提携医療機関において、HIV、HBV、HCV、HTLV および TPHA について陰性の皮膚提供者耳介後部より約 1 cm² の皮膚組織片を採取する。

2. 培養

提供された皮膚組織はただちに医療機関に併設された cell processing center (CPC) に移され、皮膚小片をポビドンヨードで処理する〔ポビドンヨードは曝露時間にもよるが細胞障害性が比較的少なく、「日本薬局方に準拠した滅菌法及び微生物殺菌法」（日本規格協会）によると広範囲の抗菌スペクトルを示すことからわれわれはこれを選択している〕。次いで、デイスパーゼ処理により表皮と真皮を剥離し、得られた真皮を組織培養用

*1 株式会社セルバンク

*2 RD クリニック渋谷

*3 東海大学医学部形成外科学

*4 東海大学医学部救命救急医学

ディッシュに静置し、組織培養を開始する。真皮から線維芽細胞が出現（アウトグロース）したら、これを採取し、継代培養して製剤を調整する。

3. 工程検査

製造工程中における進捗管理は、細胞の増殖速度には患者による個体差があるという特殊性から、一定のスケジュールでは行っていない。毎日の目視および位相差顕微鏡による観察で細胞の増殖状況を把握し、それを元にコンフルエントの段階で継代を行う。なお、われわれが行っている治療に用いる細胞は、継代上限を5回以下と規定している。

4. 製剤の調整

線維芽細胞を培養フラスコへ播種し、コンフルエント状態になるまで数日間培養する。細胞の形態に異常のないことを顕微鏡下で確認したうえで（位相差顕微鏡で細胞形態を撮影）線維芽細胞を酵素処理により回収し、製剤を調整する。

製造記録には培養フラスコから回収された細胞数、調整量、線維芽細胞の位相差顕微鏡写真、細胞算定時の写真が記載される。最終製品の品質保証書には培養フラスコから回収された細胞数、調整量、最終細胞生存活性、エンドトキシン検査の結果、マイコプラズマ検査の結果、個人識別検査の結果を記載している。

5. マスターセルとワーキングセルについて

重複して治療を行う場合や、治療日の目処が不明の場合は、細胞は凍結保存することが前提である。そのためにマスターセルを確保する必要がある。

＜マスターセルの作製＞

真皮から採取した線維芽細胞の浮遊液を培養フラスコ（75 cm²）へ播種して培養を開始し、コンフルエントになった時点で、線維

芽細胞を酵素処理により回収する。マスターセルとして凍結保存し、3～5継代目の線維芽細胞はワーキングセルとして使用している。

6. 血清の安全性確保

線維芽細胞培養用の血清は、安全性を確保し未知のウイルス感染の危険性を極力低減させるため、ならびに増殖効率の観点から⁵⁾自己血清を使用している。

7. 製品の品質管理法について

製剤の製造においては、ロットごとにマイコプラズマ検査およびエンドトキシン検査で陰性を確認している。さらに、製造記録および品質証明書を作成して保管することにより、履歴追跡に対処するシステムを構築している。これにより、施術室ドクターサイドで作成した臨床記録とCPC（培養技術者サイド）で作成した製造記録書を対比させることにより、ある患者に対していつ使用された製剤は、いつ、だれが製造し安全性を保証したものであるかを確認することができる。

最終製品の品質管理は、製造工程中における進捗管理の結果、完成品とされた後、実施されるものであるが、マイコプラズマ否定試験〔第14改正日本薬局方一般試験法参考情報「バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験」（ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による検出法）およびエンドトキシン検査（第14改正日本薬局方一般試験法「エンドトキシン試験」（ゲル化法））については、最終製品で確認を行うとその結果は患者へ提供後にしか得られないことから、最終培養上清についての試験を実施している。また、次項で詳細を述べるとおり、最終製品においては生細胞率の測定、VNTR法による個人識別を実施している。

8. 同一性の確認試験・製造時の取り違い防止策

作業手順書の遵守，作業記録，患者ごとに色分けしたラベリング，表示などにより，取り違い防止を図り，最終製品においては細胞の遺伝子解析を行い，患者の採取血液分析結果との同一性を確認している。具体的には，Whatman キットを用いてゲノム DNA を抽出し，VNTR 部位である MCT118（16塩基の繰り返し配列からなり，この繰り返し数を測定することで個人識別を行うことができる）を，ターゲットに PCR 解析し，各個人に特異的なバンドを検出している。

II 真皮線維芽細胞移植の臨床

治療に際しては，規定数以上の自己真皮線維芽細胞を含んだ細胞懸濁液を作製し，これを皮内注射の要領で真皮内に細かく注入していく。注入に先立って，治療部位にはリドカイン貼付剤および局所麻酔剤含有クリームを使用した表面麻酔を行う。注入時の疼痛が強い場合は，各種ブロック麻酔を併用することもある。

通常，注入後の発赤や皮下出血は非常に軽微で，それらが生じた場合でも数日以内に消失することがほとんどである。細胞とともに注入された懸濁液が吸収されるまでに3日ほど要するため，軽度の腫脹を気にする患者には事前にそのことを伝えておく必要がある。

注入後は特別な処置は必要なく，日常生活の制限も行わない。注入後少なくとも1~2カ月は大きな変化は見られないため，効果判定のための検診は1カ月時，3カ月時，6カ月時，1年時に行っている。

効果の現れ方は個々の細胞の状態や移植床である皮膚の状態によってさまざまであり，効果の大きさ，発現までの期間ともに個人差が大きいという印象がある。

年齢と効果の関係については，正確な調査を行っていないため非公式な見解ではあるが，50歳代半ば以降で明らかな効果の見られない症例の割合が増加する傾向がある。加齢とともに減少する真皮線維芽細胞の分裂可能回数と，治療に要する分裂回数のバランスが関係していると考えられるが，前者は個人差が非常に大きく，後者もさまざまな要因で大きく変化するため，一定の結論を得るまでには至っていない。実際，50~60歳代であっても十分な改善効果が見られる症例も少ないため，一概に年齢と効果に相関があるとは言えないというのが筆者の個人的な見解である。

本治療の効果は初回治療による改善効果と，その後の継続治療による維持効果とに大別できる。継続治療を行う際は，初回治療に先立って採取した細胞を液体窒素内に凍結保存しておき，治療のたびにそれを解凍して使用している。通常美容医療における効果とは，現状からどれだけ変化したかという意味で使用されるため，これから述べる有効度については初回治療における改善効果を検討したものと考えていただきたい。

有効度の判定は非常に困難であるが，治療前および初回治療終了後3カ月以降の写真による比較において，患者本人が気にしていたしわや陥没，たるみなどに明らかな改善が認められたものを有効，変化は認められるが改善度が小さく範囲も限定されているものをやや有効とした。有効かやや有効か判定しがたい場合は患者が結果に満足しているか否かを加味して判断した。また，医師，患者ともに変化を認識できなかったものを無効とした。2008年3月の時点で，過去5年間における有効率は，有効48%（272例），やや有効19%（108例），無効32%（182例）であった。

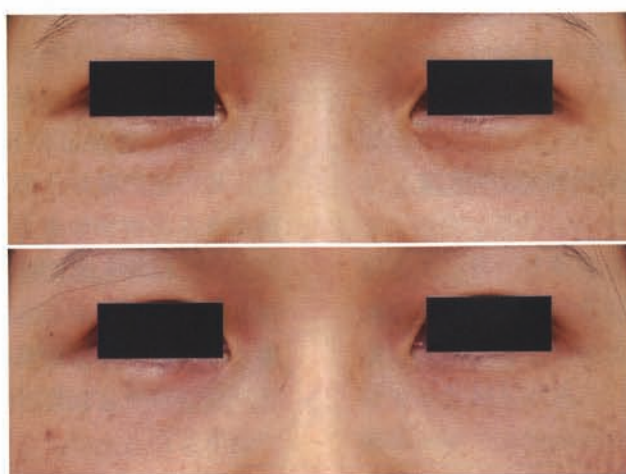
これまでに有害事象と考えられるような合併症や副作用は認めておらず，ごくまれに比較的大きな皮下出血を生じたものや，軽度



(a) 治療前

(b) 治療後7カ月

図1 症例1：51歳，女性



(a) 治療前

(b) 治療後1年

図2 症例2：41歳，女性

の発赤を伴った掻痒を認めた例があったが、いずれも数週間程度の一過性のものであった。

Ⅲ 症 例

【症例1】51歳，女性

鼻唇溝に対して治療を行った。治療後7カ月の検診において、しわの改善（有効度：有効）が見られた（図1）。

【症例2】41歳，女性

下眼瞼に対して治療を行った。治療後1年の検診において、しわおよび窪みの改善（有効度：やや有効）が見られた（図2）。

【症例3】35歳，女性

鼻唇溝に対して治療を行った。治療後2年

3カ月の検診において、たるみの改善（有効度：有効）が見られた（図3）。

【症例4】33歳，女性

下眼瞼に対して治療を行った。治療後3カ月の検診において、しわおよび隈の改善（有効度：有効）が見られた（図4）。

【症例5】59歳，女性

下眼瞼に対して治療を行った。初回治療でしわ、たるみの改善（有効度：有効）が得られ、その後の継続治療で改善状態が維持されている。この間に1回の維持治療を行っている（図5）。

【症例6】52歳，女性

下眼瞼に対して治療を行った。初回治療で細かいしわの改善（有効度：有効）が得られ、



(a) 治療前

(b) 治療後2年3カ月

図3 症例3：35歳，女性



(a) 治療前

(b) 治療後3カ月

図4 症例4：33歳，女性

その後の継続治療で改善状態が維持されている。この間に2回の維持治療を行っている(図6)。

IV 考察

本治療は初回治療の後も定期的に治療を行うことによって、得られた効果を長期間維持することが可能である。その場合、治療開始時に得られた細胞を凍結保存し、細胞をさまざまな細胞ストレスから隔離することで、採取当時の機能を保持した細胞を繰り返し治療に用いることができる。

この維持治療というオプションによって、短期間に皮膚の形態を変える美容外科医療

と、長期にわたって皮膚の質、機能を維持するための再生医療という両者の目的の違いが明確となる。

継続的に治療を行っている患者の多くは初回治療である程度以上の効果が得られているため、維持治療の有効性については母集団にバイアスがかかっていると考えられるが、維持治療を行っているおおむねすべての患者において皮膚の状態が維持されている。われわれの行った追試では、現在まで有害事象の経験は皆無であり、FDAにおいても有害事象の報告がないため、安全性に関して何ら疑う余地はないと考える。しかし、有効性については、明らかな改善例がある一方で、変化が軽微な症例も多数経験しており、この点を

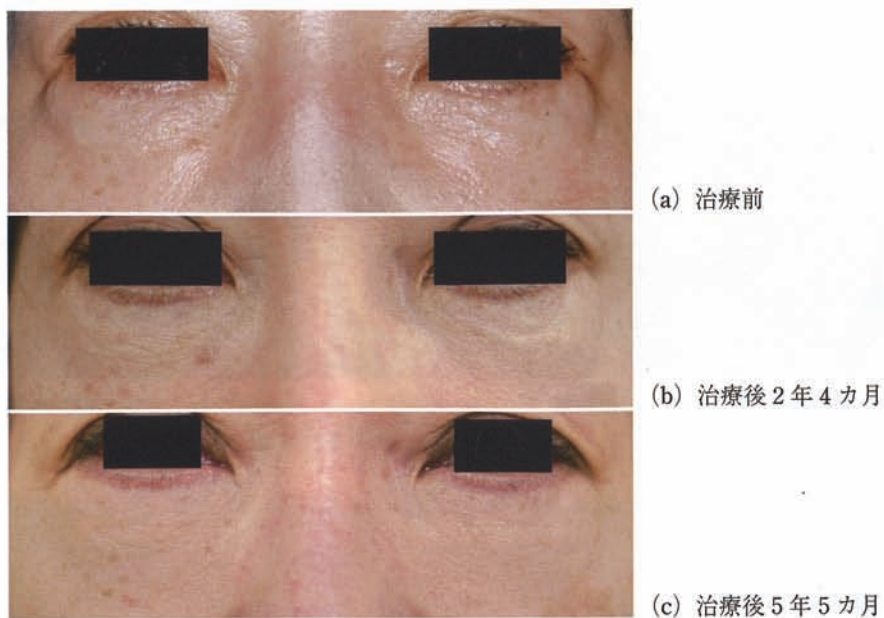


図 5 症例 5：59 歳，女性

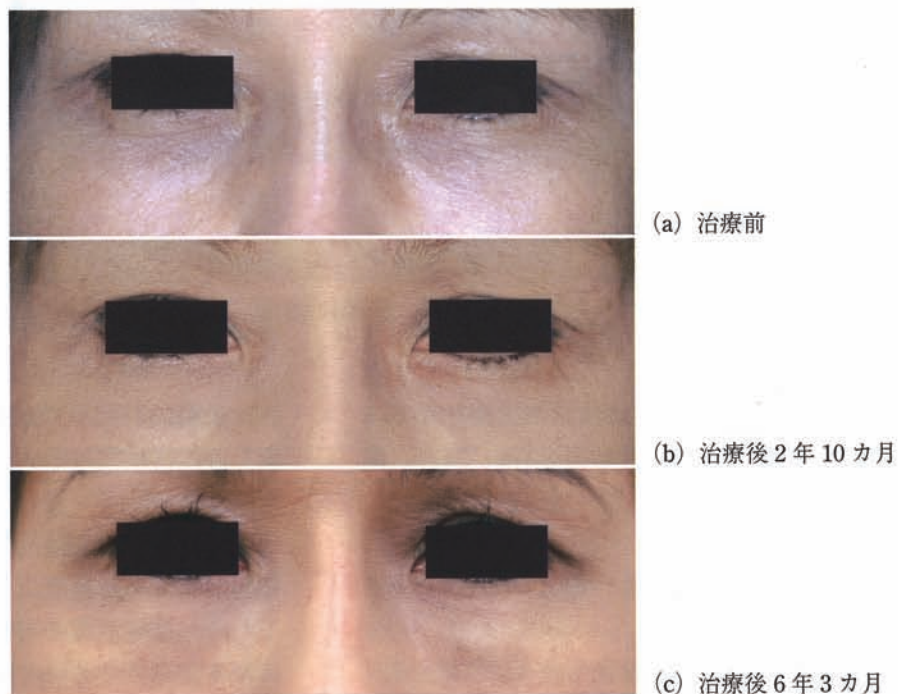


図 6 症例 6：52 歳，女性

十分術前に患者に告知し理解を得ることが、本治療法で患者満足度を上げる最も大切な点であると考えている。

まとめ

美容医療に自己の培養した線維芽細胞を用いるコンセプトは米国 Isolagen 社が事業化し、FDA のフェーズ 3 を進行中の治療で

ある。今回われわれが同方法の大規模な追跡調査を行った結果、本法は明らかな美容医療的効果を求める患者には不適當であるものの、患者を慎重に選定すればエイジングケアに対する治療の1つの選択肢であると言える。

引用文献

- 1) Watson D, Keller GS, Lacombe V, et al : Autologous fibroblasts for treatment of facial rhytids and dermal depressions ; A pilot study. *Arch Facial Plast Surg* 1 : 165-170, 1999
- 2) Weiss RA, Weiss MA, Beasley KL, et al : Autologous cultured fibroblast injection for facial contour deformities ; A prospective, placebo-controlled, Phase III clinical trial. *Dermatol Surg* 33 : 263-268, 2007
- 3) Boss WK Jr, Usal H, Chernoff G, et al : Autologous cultured fibroblasts as cellular therapy in plastic surgery. *Clin Plast Surg* 27 : 613-626, 2000
- 4) Boss WK Jr, Usal H, Fodor PB, et al : Autologous cultured fibroblasts ; A protein repair system. *Ann Plast Surg* 44 : 536-542, 2000
- 5) Zhao Y, Wang J, Yan X, et al : Preliminary survival studies on autologous cultured skin fibroblasts transplantation by injection. *Cell Transplant* 17 : 775-783, 2008
- 6) Mazlyzam AL, Aminuddin BS, Saim L, et al : Human serum is an advantageous supplement for human dermal fibroblast expansion ; Clinical implications for tissue engineering of skin. *Arch Med Res* 39 : 743-752, 2008

ABSTRACT

Facial Rejuvenation Using Injection of Autologous Cultured Dermal Fibroblasts

Motoharu Hojo, MD *^{1, *3}, *Jun Yoshida, MD* *² and *Ayano Hikari* *^{1, *4}

Injection of living autologous cultured fibroblasts is an Isolagen protein repair treatment. This treatment has been used for treating rhytids, depressed scars, subcutaneous atrophy, and acne irregularities. Previous data indicate that injections of living autologous fibroblasts increase collagen formation, accompanied by a concomitant increase in thickness and density of dermal collagen. Furthermore, to determine efficacy and side effects, a prospective, placebo-controlled, Phase III clinical trial was performed in the United States (N=215). This study verified the so-called Isolagen protein repair treatment. In conclusion our results indicate that autologous fibroblast injections can also be performed safely and effectively in Orientals (Japanese).

*¹ *CellBank Corporation, Tokyo 108-0073*

*² *RD-Clinic Shibuya, Tokyo 150-0002*

*³ *Tokai University, School of Medicine Department of Plastic Surgery, Isehara 259-1193*

*⁴ *Tokai University, School of Medicine Department of Emergency and Critical Care Medicine, Isehara 259-1193*